

平成24年 4月10日現在

機関番号：12401  
 研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20380004  
 研究課題名（和文） 分子シグナル解析によるストレス抵抗性植物の育種基盤

研究課題名（英文） Breeding basis for stress resistant plants by  
 molecular signal analysis

研究代表者 内宮 博文（UCHIMIYA HIROFUMI）  
 埼玉大学・環境科学研究センター・教授  
 研究者番号：50142229

## 研究成果の概要（和文）：

植物におけるストレス応答は、活性酸素などに対する細胞機能の防御反応でもある。酸化還元物として主要な役割を担うニコチンアミドヌクレオチド補酵素は典型的な制御因子である。本研究では、植物の外的環境応答を解析するため補酵素代謝系に焦点を当て、ストレス抵抗性植物分子育種の基盤構築を試みた。イネやアラビドプシスを対象とし、遺伝子発現と代謝解析の結果、補酵素をコードする遺伝子により耐性植物の作出を実証した。

## 研究成果の概要（英文）：

In plants, stress responses is a mechanism underlying cell defense functions to oxidative damage. In this regard, NAD coenzymes are typical regulators. Here, we focused on such enzymes (genes) to clarify environmental responses of plants against external stresses. At end, we were able to establish new strategies concerning molecular improvements of plants against environmental constrains.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2009年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2010年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：育種学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード： ストレス応答、シグナル因子、NAD、補酵素、代謝物質、遺伝子、酸化還元反応、分子育種

## 1. 研究開始当初の背景

本申請書は平成20年から23年までの3年間にわたり、以下の研究背景のもとに具体的なテーマを選定する。当該研究の学術的特色および独創的点に関しては、以下の点に特徴がある。

外的なストレスに強い植物とは、細胞死に至る機構が可変的に抑制状態にある細胞集団とえることができる。細胞が自ら死ぬ能力

は多細胞生物が有する基本的な生命現象の一つでもあり、厳密に制御されたシグナル伝達系を介している。ストレス応答の基本は、ROSなどに対する植物の応答でもある。酸化還元物として主要な役を担う補酵素はその典型的なシグナル因子であるともいえる。

申請者はこれまで、植物のストレス応答を細胞死の面から解析する目的で、関連遺伝子

の単離およびストレス耐性獲得機構との関係について研究を遂行してきた。例えば、イネの子葉鞘は種子が水中等の低酸素条件にある時は著しく細胞伸長し、空气中に達するまで胚を保護するが、その際NADキナーゼが重要であることを示した (Plant Phy, 2002 など)。一方、イネの遺伝子解析から、NADを補酵素とするタンパク質の解析を行い、OsHCTR (新規の DFR) 遺伝子を発現する形質転換イネを作成した。その結果、形質転換イネ植物体は、種々のストレスへ耐性を示した (Molecular Breeding, 2002, Proc. Nat. Acad. Sci., 2004)。そのような植物ではNADの生産に関する酵素の活性化とNADそのもののプールの増加が確認された。すなわち、補酵素の代謝活性化がストレス抵抗性の獲得につながる可能性が指摘された。最近では、補酵素関連遺伝子の解析により、環境応答との関連、分化や形態形成などとの関連にも新たな進展がみられた (Plant J. 2006, Plant Cell Phys. 2007)。

## 2. 研究の目的

本研究では、以下の点を明らかにする。すなわち、植物のストレス応答を細胞の生死と代謝調節の面から解析する。特に、NAD代謝系に焦点を当て、ストレス抵抗性植物分子育種の基盤を構築する。すでに我々はイネから新規のフラボノイド合成に関与する遺伝子を解析し、ストレス抵抗性とNAD代謝系との関係を明らかにした (Proc. Nat. Acad. Sa 2004)。ニコチンアミドヌクレオチド (NAD<sup>+</sup>, NADP<sup>+</sup>) は、生体内で種々の酸化還元反応を触媒する脱水素酵素の補酵素である。これらの補酵素は細胞内では様々な代謝系を介して合成され、数百に及ぶ酸化還元反応を制御している。本研究は、NAD代謝に関する遺伝工学的制御により、ストレス耐性分子育種法の構築を目指す。最近の研究により、ROSは発生や分化にも必須であることが、当研究室の研究で示された (Plant J. 2006)。そこで、花粉の発芽における役割や寿命の制御も検討する。補酵素は光合成の酸化還元に必要な機能を有する。従って、光反応により生じた還元シグナルが植物の炭素や窒素の代謝反応にどのように影響するのかを調べる。これにより、個体レベルでの代謝維持機構の解明に結びつける。NAD補酵素および代謝産物はエネルギー伝達のみならず、シグナル伝達やゲノム安定性に関与する。本研究ではNAD生合成・代謝を介した植物発育制御およびストレス耐性における役割を明らかにし、関わる経路・因子の同定を試みる。NAD生合成の鍵酵素であるNMNATのドミナントネガティブシステムの作出や酸化ストレス応答性についての研究は重要である。研究の中心は活性酸素による下流の防禦系をいかに抑制

するかに特徴がある。国内外における関連研究は耐病性に集中している。代謝物をシグナル因子として扱ったストレス耐性に関する研究は新規性が高い。

## 3. 研究の方法

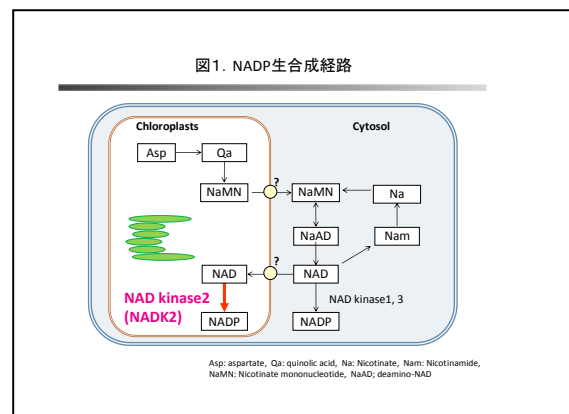
本研究では、現在までに、シロイヌナズナのNADS, NMNAT, NADK2の過剰発現植物を作製中である。本研究では、これら3つのNAD代謝酵素遺伝子を過剰発現させたイネが示す形質を明らかにするために、細胞内代謝と生育、ストレス耐性に注目し解析を進める。研究の概要は以下の如くである。

### NADS, NMNAT, NADK2 過剰発現植物の解析

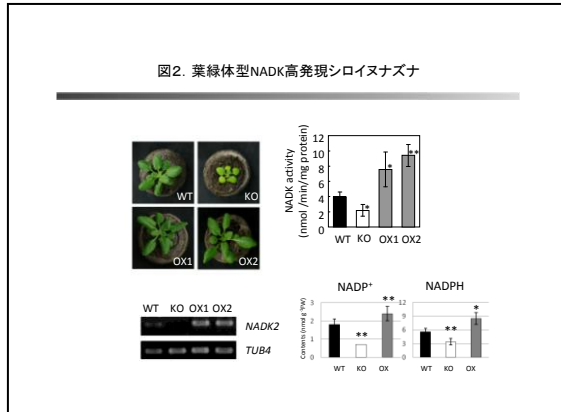
- 3つの過剰発現イネに対して、それぞれ導入した遺伝子発現および酵素活性が異なる少なくとも5つのlineを確立し、NAD代謝酵素の活性測定、NAD(P)(H)量の定量、導入遺伝子の発現量の確認を行う。
- 確立したlineについて表現型の観察(生重量、植物体のサイズ、種子の数及びサイズ、クロロフィル量、光合成など)を行う。
- 葉、及び種子の代謝解析(CE-MSを用いた有機酸、アミノ酸、糖リン酸、核酸の定量)を行う。
- ストレス応答性(乾燥、高温、低温、病害応答など)を解析する。
- カルビンベンソン回路の酵素群の活性測定、および光合成測定を行う。
- データの統計的解析を進め、主成分分析、クラスター解析を用い、メタボローム解析結果を検討する。

## 4. 研究成果

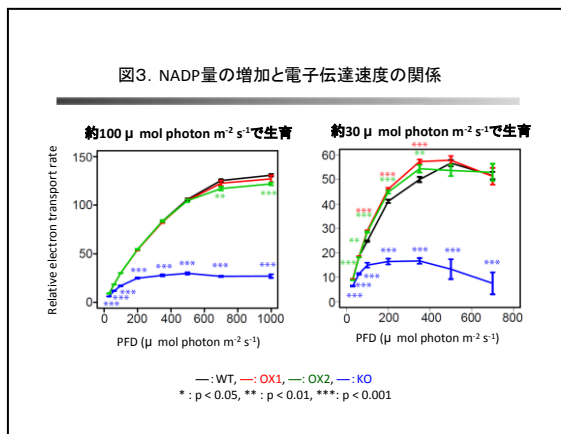
植物におけるストレス応答は、活性酸素などに対する細胞機能の防御反応でもある。酸化還元物として主要な役割を担う補酵素類は典型的な制御因子である。本研究では、植物の外的環境応答を解析するため補酵素代謝系に焦点を当て、ストレス抵抗性植物分子育種の基盤構築を試みた。ニコチンアミドヌクレオチドは、生体内で種々の酸化還元反応を触媒する脱水素酵素の補酵素である。これらの補酵素は細胞内では様々な代謝系を介して合成され、数百に及ぶ酸化還元反応を制御する。また補酵素は光合成や呼吸等の酸化還元系に重要であり、分子シグナルとしても機能する可能性がある。図1にニコチンアミドヌクレオチド代謝経路を示す。



本研究では、光反応により生じた還元シグナルが、植物の炭素や窒素の代謝反応に影響する直接的因子であることが示された。NAD代謝に関与する遺伝子の機能およびNAD代謝系の活性化とストレス耐性との関与を解析した。そのため、イネやシロイヌナズナのニコチンアミドヌクレオチドの過剰発現植物を作製し、発現形質の変化を明らかにした。図2に葉緑体で機能する酵素の、過剰発現の効果を示す。

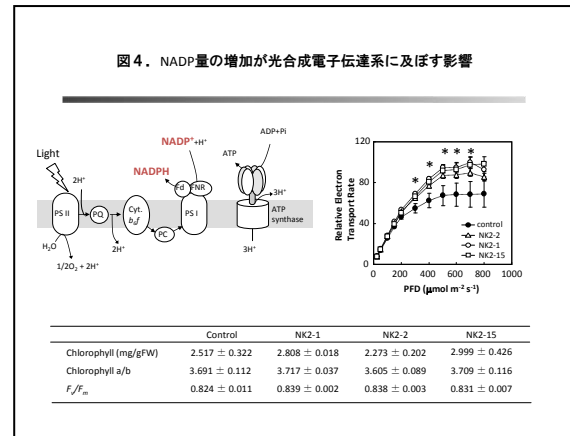


細胞内代謝と生育、ストレス耐性に関してさらなる解析を進め、本因子との関係が明らかになった。すなわち、過剰発現体における、遺伝子発現、NAD代謝酵素の活性測定、NAD(P)(H)量の定量、導入遺伝子発現データにより補酵素による分子シグナルの存在が示唆された。図3に光強度の違いによる電子伝達に及ぼす影響を解析した結果を示す。



また、表現型の観察（生重量、植物体のサイズ、種子の数及びサイズ、クロロフィル量、光合成）、代謝解析（有機酸、アミノ酸、糖リン酸、核酸の定量）を行った。データの統計的解析を進め、主成分分析、クラスター解析を用い、メタボローム解析結果を検討した。また、NAD代謝に関する遺伝子の解析

を行い、カルビンベンソン回路の酵素群の活性測定、および光合成に及ぼす効果が確認された。図4に電子伝達系に関与する光合成パラメーターについての実例を示す。



研究成果は論文、学会等にて公開した。

以上により本研究目標であるストレス抵抗性植物の分子育種に関わる研究基盤の構築に貢献できた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 24 件)

- ① Miyagi, A., Takahara, K., Kasajima, I., Takahashi, H., Kawai-Yamada, M. and Uchimiya, H., Fate of <sup>13</sup>C in Metabolic Pathways and Effects of High CO<sub>2</sub> on the Alteration of Metabolites in *Rumex obtusifolius* L., *Metabolomics* 7:524-535, 2011, 査読有
- ② Hashida, S-N., Takahashi, H., Takahara, K., Nagano, M., Kawai-Yamada, M., Shoji, K., Goto, F., Yoshihara, T., Uchimiya, H., Nicotinate/nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase-mediated regulation of NAD biosynthesis protects guard cells from reactive oxygen species in ABA-mediated stomatal movement in *Arabidopsis*, *Journal of Experimental Botany* 61:3813-3825, 2010, 査読有
- ③ Takahara, K., Kasajima, I., Takahashi, H., Hashida, S., Itami, T., Onodera, H., Toki, S., Yanagisawa, S., Kawai-Yamada, M., and Uchimiya, H., Metabolome and photochemical analysis of rice plants over-expressing *Arabidopsis* NAD kinase gene, *Plant Physiology* 152:1863-1873, 2010, 査

- 読有
- ④ Miyagi, A., Takahara, K., Takahashi, H., Kawai-Yamada, M., and Uchimiya, H., Targeted metabolomics in an intrusive weed, *Rumex obtusifolius* L., grown under different environmental conditions reveals alterations of organ related metabolite pathway, *Metabolomics* 6:497-510, 2010, 査読有
- ⑤ Kawai-Yamada, M., Hori, Z., Ogawa, T., Ihara-Ohori, Y., Tamura, T., Nagano, M., Ishikawa, T., and Uchimiya, H., Loss of calmodulin binding to bax inhibitor-1 affects *pseudomonas*-mediated hypersensitive response-associated cell death in *Arabidopsis thaliana*, *Journal of Biological Chemistry* 284:27998-28003, 2009, 査読有
- ⑥ Takahashi, H., Takahara, K., Hashida, S.-N., Hirabayashi, T., Fujimori, T., Kawai-Yamada, M., Yamaya, T., Yanagisawa, S., and Uchimiya, H., Pleiotropic Modulation of Carbon and Nitrogen Metabolism in Arabidopsis Plants Overexpressing the *NAD kinase2* Gene, *Plant Physiology* 151:100-113, 2009, 査読有
- ⑦ Negi, J., Matsuda, O., Nagasawa, T., Oba, Y., Takahashi, H., Kawai-Yamada, M., Uchimiya, H., Hashimoto, M., and Iba, K., CO<sub>2</sub> regulator SLAC1 and its homologues are essential for anion homeostasis in plant cells, *Nature* 452:483-488, 2008, 査読有

[学会発表] (計 54 件)

- ① 宮城敦子、高原健太郎、川合真紀、内宮博文、強害帰化雑草エゾノギンギシの器官別メタボローム解析、第5回メタボロームシンポジウム、慶応義塾大学先端生命科学研究所 (山形) (2010. 9. 9-11)
- ② 笠島一郎、高原健太郎、川合真紀、内宮博文、光阻害耐性のイネ品種間差、日本育種学会第 117 会講演会、京都大学吉田キャンパス (2010. 3. 27)
- ③ 高原健太郎、笠島一郎、小野寺治子、土岐精一、川合真紀、内宮博文、ニコチンアミド補酵素生合成を改変した形質転換イネの解析、第 27 回日本植物細胞分子生物学会 (藤沢) 大会・シンポジウム、日本大学生物資源科学部 湘南キャンパス (2009. 7. 30-31)
- ④ 笠島一郎、高原健太郎、川合真紀、内宮博文、パルス変調クロロフィル蛍光測定を利用したイネ品種間差の解析、日本育

種学会 第 115 回講演会、つくば国際会議場 (2009. 3. 27-28)

- ⑤ 橋田慎之介、高橋秀行、高原健太郎、長野稔、川合真紀、内宮博文、NAD 生合成酵素 NMNAT による気孔閉鎖運動の制御、第 50 回植物生理学会年会 名古屋大学 東山キャンパス (2009. 3. 21-24)
- ⑥ 高原健太郎、高橋秀行、小野寺治子、土岐精一、川合真紀、内宮博文、葉緑体局在型 NAD リン酸化酵素の高発現がイネの酸化ストレス耐性と一次代謝に及ぼす影響、日本育種学会第 114 回講演会、滋賀県立大学 (2008. 10. 11-12)
- ⑦ 宮城敦子、高橋秀行、西村芳樹、高原健太郎、手塚修文、川合真紀、内宮博文、タデ科ギンギシ属植物の代謝物解析、日本植物学会 72 回大会、高知大学朝倉キャンパス (2008. 9. 25-27)
- ⑧ Takahara, K., Takahashi, H., Onodera, H., Toki, S., Kawai-Yamada, M., Uchimiya, H., EFFECTS OF OVEREXPRESSION OF AN ARABIDOPSIS NAD KINASE IN THE CHLOROPLAST OF RICE PLANTS ON TOLERANCE TO OXIDATIVE STRESS AND PRIMARY METABOLISM, 5<sup>th</sup> International Conference on Plant Metabolomics, Pacifico Yokohama-JAPAN (2008. 7. 15-18)

[図書] (計 1 件)

- ① Das, A., Kawai-Yamada, M., and Uchimiya, H., Programmed Cell Death in Plants, *Abiotic Stress Adaptation in Plants: Physiological, Molecular and Genomic Foundation* (Springer) 371-383, 2010.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等  
埼玉大学環境科学研究センター  
<http://iest.saitama-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内宮 博文 (UCHIMIYA HIROFUMI)  
埼玉大学・環境科学研究センター・教授  
研究者番号：50142229